



Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa
Ano Letivo 2015/2016

Clínica Universitária de Hematologia
Diretor: Prof. Doutor Forjaz Lacerda



Trabalho Final de Mestrado Integrado em Medicina

O Potencial Valor dos Micro-RNAs como Biomarcadores no Mieloma Múltiplo

Artigo de Revisão

Discente: Maria Inês Pedro de Carvalho

Orientadora: Dra. Helena Martins

Lisboa, 8 de Junho de 2016

Abstract

Since the discovery of the relation between miRNA and cancer that miRNAs have been largely investigated. Their ability to add a different level of gene regulation and to target genes apparently not linked to each other has intrigued researchers. In this review, the role of miRNAs in multiple myeloma (MM) is analyzed, with particular attention to their potential as biomarkers. The potential role of circulating miRNAs in risk stratification is also discussed. Finally, the critical issues in miRNA analysis in MM and ongoing strategies to solve them are discussed. The ability to standardize miRNA analysis procedures will permit the inclusion of miRNA evaluation alongside available stratification tools, improving the management of MM patients.

Keywords: *biomarkers; circulating miRNAs; exosomes; miRNAs; multiple myeloma; prognostic; staging system*

Resumo

Desde a descoberta da ligação entre miRNA e cancro, que os miRNAs têm sido amplamente investigados. A sua capacidade de regular a expressão de genes, aparentemente não relacionados entre si, tem intrigado bastante os investigadores. Nesta revisão, o papel dos miRNAs no mieloma múltiplo (MM) é analisado, dando especial atenção ao seu potencial como biomarcadores. O potencial papel dos miRNAs circulantes na estratificação de risco é também discutido. Finalmente, os pontos críticos na avaliação de miRNA em MM e as estratégias em curso para resolvê-los são discutidos. A padronização dos procedimentos de análise de miRNA permitirá a inclusão da avaliação miRNA ao lado de ferramentas de estratificação disponíveis de forma a melhorar a gestão dos pacientes com MM.

Palavras-chave: biomarcadores; miRNAs circulantes, exossomas, miRNAs, mieloma múltiplo, prognóstico, estadiamento

Índice

| | |
|--|----|
| Abstract | 1 |
| Resumo..... | 1 |
| Abreviaturas | 4 |
| I. Introdução | 5 |
| II. Metodologia..... | 7 |
| III. Micro-RNAs – o que são e qual o seu papel na patogénese do MM | 8 |
| Micro-RNAs | 8 |
| Papel dos miRNAs na patogénese do MM | 8 |
| IV. Micro-RNAs como importantes biomarcadores no MM | 10 |
| Desregulação de miRNAs nos diferentes estadios do MM | 11 |
| Micro-RNAs e prognóstico no MM | 12 |
| Micro-RNAs extracelulares – potenciais marcadores de prognóstico no MM | 13 |
| V. Pontos críticos relativos ao uso de miRNAs | 15 |
| VI. Conclusão..... | 15 |
| VII. Agradecimentos | 16 |
| Referências Bibliográficas | 17 |
| Anexos..... | 21 |

Anexos

| | |
|--|----|
| Anexo 1 – miRNA e via de sinalização IL6-STAT3 no MM: papel dos miR-21 e -19 na promoção de STAT3 ¹⁶ | 23 |
| Anexo 2 – miRNA e p53 no MM ¹⁶ | 25 |
| Anexo 3 – <i>miRNA network</i> e a patogênese do MM ²⁶ | 27 |
| Anexo 4 – miRNAs e genes significativamente desregulados na GMSI e no MM vs plasmócitos normais ¹³ | 29 |
| Anexo 5 – Associação miR-19a e miR-4254 – biomarcador poderoso para identificar MM ³⁷ | 31 |
| Anexo 6 – Comparação expressão miR-33b entre 58 MM recentemente diagnosticados, 11 recidivas, 12 em remissão e 18 indivíduos saudáveis. ³² | 33 |
| Anexo 7 – Correlação entre expressão de miR-15a, miR-16-1, cluster miR-17-92 e SLP - Maior expressão associada a SLP mais curta ³⁴ | 35 |
| Anexo 8 – Análise sobrevivência em MM recentemente diagnosticados - menor expressão de miR-33b associada a SLP e SG significativamente mais curtas ³² | 37 |
| Anexo 9 – Expressão de miR-155 e SG ⁴¹ | 39 |
| Anexo 10 – Biogênese de miRNAs ²⁶ | 41 |
| Anexo 11 – Expressão de DICER nos diferentes estádios de MM e correlação com SLP ⁴³ | 43 |
| Anexo 12 – miR-16 e miR-25 ^{10, 44} | 45 |
| Anexo 13 – Valor prognóstico do nível de expressão miR-19a no MM ³⁷ | 47 |
| Anexo 14 – miR-483-5p extracelular no MM ¹¹ | 49 |
| Anexo 15 – Expressão de miRNAs em diferentes estádios MM e relação SLP pós transplante com miR-19b/-331 ¹⁰ | 51 |
| Anexo 16 – miRNAs desregulados no MM ¹⁶ | 53 |
| Anexo 17 – miRNAs expressos no MM ⁹ | 55 |

Abreviaturas

AUC – Área sob a curva

CLL – cadeias leves livres

Del – deleção

FISH – hibridização fluorescente *in situ*

IgH – cadeia pesada da imunoglobulina

ISS – *International Staging System*

GMSI – gamapatia monoclonal de significado indeterminado

miRNA/miR- – micro-RNA

MM – mieloma múltiplo

MO – medula óssea

SG – sobrevivência global

SLP – sobrevivência livre de progressão

sMM – mieloma múltiplo indolente ou *smoldering*

t(x;y) – translocação entre o cromossoma x e y

I. Introdução

O mieloma múltiplo (MM) é uma doença neoplásica hematológica, incurável, caracterizada por uma proliferação aberrante de plasmócitos clonais na medula óssea, normalmente associada a secreção de imunoglobulinas monoclonais detetadas no soro e/ou na urina¹.

É a segunda neoplasia hematológica mais frequente, representando atualmente 10% das neoplasias hematológicas, com incidência crescente em todo o mundo (incidência ajustada a idade de 6 por 100 000 por ano nos E.U.A e Europa).^{1,2} Mais comum em homens e duas vezes mais comum em afro-americanos³, o MM apresenta uma idade média de diagnóstico de 69 anos, com três quartos dos doentes a serem diagnosticados acima dos 55 anos.¹

O MM associa-se a um amplo espectro clínico, com a maioria dos casos a evoluir a partir de um estadio pré-neoplásico assintomático denominado gamapatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI)^{4,5}. Este pode progredir, posteriormente, para um estadio intermédio, também assintomático, designado mieloma múltiplo indolente ou *smoldering* (sMM), acabando por evoluir para MM sintomático a uma taxa aproximada de 10% por ano nos primeiros 5 anos após diagnóstico, 3% por ano nos 5 anos seguintes e a 1,5% por ano depois desse tempo^{2,3}. Esta taxa de progressão é influenciada pelo tipo citogenético da doença, sendo que a presença de translocação t(4;14), deleção 17p e amplificação 1q parecem constituir um maior risco de progressão.³ Em determinados casos de MM, mais agressivos, pode ocorrer evolução para MM extra-medular (em aproximadamente 8% dos doentes), que se apresenta por uma fase leucémica (leucemia plasmócitos secundária a MM).³

Apesar da sua apresentação clínica extremamente variável, o MM manifesta-se mais frequentemente por anemia, insuficiência renal, hipercalcémia, aumento da suscetibilidade a infeções bacterianas^{1,6} e, principalmente, lesões osteolíticas, que constituem a principal causa de morbilidade nestes doentes³.

O diagnóstico, baseado nas guidelines do *International Myeloma Working Group*, é feito quando se verificam os seguintes critérios: presença de mais de 10% de plasmócitos clonais no mielograma ou existência de plasmocitoma ósseo ou extra-medular em biópsia, e presença de lesão de órgão alvo (hipercalcemia, Insuficiência renal, anemia, lesão óssea). Caso a lesão de órgão não se verifique, uma plasmocitose medular superior a 60% faz o diagnóstico.^{3,7}

A avaliação laboratorial de indivíduos com suspeita clínica de MM deve incluir eletroforese de proteínas, imunofixação sérica e urinária e análise das cadeias leves livres (CLL) séricas, de forma a determinar a presença de proteína M. De realçar que aproximadamente 2% dos doentes têm mieloma não-secretor, não havendo evidência de proteína M em qualquer um destes testes.³

O prognóstico no MM depende de fatores do doente (como a idade, performance status e comorbilidades), do estadiamento, da agressividade da doença e da resposta à terapêutica. Relativamente ao estadiamento, o *International Staging System* (ISS) e o *Durie-Salmon Staging System* são os mais utilizados, sendo o primeiro preferido.⁸ Ambos providenciam informação prognóstica, não sendo contudo úteis na decisão terapêutica.^{3,8} O ISS baseia-se na medição de β_2 -microglobulina e albumina séricas, dividindo os doentes em 3 estadios com significado prognóstico (diferente sobrevivência global média - SG): Estadio I - $\beta_2M < 3.5$ mg/L e albumina ≥ 3.5 g/dL (62 meses); estadio II — nem I nem III (44 meses); estadio III — $\beta_2M \geq 5.5$ mg/L (29 meses).^{8,9} A presença de alterações citogenéticas, associada ao ISS, também constitui um marcador de prognóstico poderoso, com repercussões na decisão terapêutica.^{3,8} A combinação da citogenética convencional, que deteta del13/monossomia 13/hipodiploidia, com a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), que deteta t(11;14), t(6;14), t(4;14), t(14;16), t(14;20), del17p13, 1q+, trissomias e del1p32, permite a estratificação do tumor em doença de alto risco, com uma sobrevivência inferior a 2-3 anos apesar de transplante autólogo células estaminais, ou risco standard, com uma SG de 6-7 anos.⁸

Nos últimos 10 anos, a introdução de agentes imuno-moduladores (lenalidomida, pomalidomida) e inibidores de proteasomas (bortezomib, carfilzomib), associados aos agentes alquilantes (melphalan, ciclofosfamida) e aos corticosteroides, assim como a possibilidade de transplante autólogo de *stem cells* em determinados doentes, permitiu uma taxa de resposta completa superior e maior sobrevivência livre doença e SG.^{3,9,10}

Apesar da melhoria do *outcome* destes doentes com a introdução de novos tratamentos, a evidência tem enfatizado a necessidade de novos biomarcadores mais precisos, preferencialmente obtidos através de técnicas não invasivas¹⁰, que permitam uma decisão terapêutica mais dirigida com consequências na sobrevivência do doente.

Os biomarcadores são fundamentais na avaliação do prognóstico e da resposta ao tratamento, na decisão terapêutica, no diagnóstico precoce de casos oligossintomáticos e, no caso de poderem ser avaliados no plasma, podem ser potencialmente usados na avaliação da doença medular e extra-medular a qualquer momento e de uma forma não invasiva.¹⁰

Recentemente, os micro-RNAs (miRNA) têm adquirido destaque como potenciais novos biomarcadores de prognóstico e diagnóstico no GMSI e MM^{10,11}, com diversos estudos a associar diretamente o desenvolvimento tumoral com a desregulação de miRNA e a demonstrar a capacidade de perfis de expressão de miRNA em discriminar entre tipos de cancros específicos e o tecido hospedeiro correspondente normal.^{11,12}

A presente Tese de Mestrado tem como objetivo auxiliar a esclarecer, através de uma revisão bibliográfica cuidada, o conhecimento que existe sobre o papel dos miRNAs na patogénese do MM e de que forma a determinação dos miRNAs desregulados pode ser usado para estabelecer o prognóstico e o diagnóstico destes doentes.

II. Metodologia

Após definição dos objetivos essenciais da presente Tese, foi realizada uma pesquisa sistemática através das bases de dados eletrónicas *Pubmed* e *ScienceDirect*, utilizando as expressões *multiple myeloma*, *miRNAs and multiple myeloma*, *circulating microRNAs*, *prognostic biomarkers and multiple myeloma*.

Dos artigos encontrados, na janela temporal entre Janeiro de 2007 e Outubro de 2015, só foram tomados em consideração os que se encontravam em português ou inglês aos quais foi possível aceder na íntegra. Destes, foram eleitos os mais relevantes para alcançar os objetivos propostos, dada a sua pertinência e fiabilidade.

A presente revisão propõem-se a apresentar o resultado e a discussão da análise da pesquisa efetuada, através de uma estrutura própria, estando o seu texto escrito ao abrigo do novo acordo ortográfico.

III. Micro-RNAs – o que são e qual o seu papel na patogénese do MM

Micro-RNAs

Os miRNAs são pequenos RNAs não-codificantes, constituídos por aproximadamente 22 nucleótidos, que regulam a expressão de genes por um mecanismo pós-transcricional, através do qual se ligam a sequências complementares de RNA mensageiro alvo, inibindo a sua tradução ou induzindo a sua degradação.^{9,10} Os miRNAs estão, assim, envolvidos no desenvolvimento, diferenciação, apoptose, sobrevivência, senescência e metabolismo celular¹³, tendo sido demonstrado que a desregulação da sua expressão pode desempenhar um papel importante na tumorigénese.¹³

O recurso a técnicas de microarrays e PCR via transcriptase reversa quantitativa revelou que os miRNAs são diferentemente expressos nas células tumorais e identificou genes de miRNAs clínicos e biologicamente significativos em várias doenças. Estes miRNAs são identificados como *oncomiRs* se, quando sobre-expressos no cancro, têm um papel na promoção do desenvolvimento de tumores primários através da inibição de genes supressores de tumor, ou como supressores de tumor se normalmente inibem a expressão de proto-oncogenes e a sua perda ou sub-expressão se associa a desenvolvimento tumoral¹³.

Vários estudos têm demonstrado que a expressão aberrante de miRNA tem impacto prognóstico em múltiplos tumores, como é o caso da leucemia linfocítica crónica, da leucemia mielóide aguda, do cancro da mama e da próstata, não se limitando o seu papel prognóstico aos miRNAs intracelulares, mas também aos miRNAs encontrados nos diferentes fluidos corporais.^{9,14}

Tal evidência, associada ao facto dos miRNAs manterem-se estáveis por longos períodos de tempo, serem relativamente fáceis de quantificar em amostras clínicas e refletirem toda a massa tumoral (mesmo os plasmócitos ausentes ou localizados na MO), exibindo funções biológicas ligadas à progressão do tumor e fornecendo informação prognóstica, torna-os potenciais biomarcadores (não invasivos, se considerarmos os miRNAs circulantes) de prognóstico, progressão de doença e diagnóstico no MM^{10,11,15}

Papel dos miRNAs na patogénese do MM

O MM caracteriza-se por uma transformação em várias etapas, tendo sido demonstrado que certos miRNAs regulam genes e vias de sinalização envolvidas nesta transformação e, juntamente com alterações genéticas e epigenéticas, parecem formar um circuito regulador complexo, cuja desregulação pode levar a transformação maligna e progressão tumoral.¹⁶

Um dos mecanismos associados à patogênese do MM refere-se às alterações citogenéticas¹⁷, que dividem o MM em duas categorias: Hiperdiploide, que se caracteriza por trissomias múltiplas de cromossomas de número ímpar (exceto cromossoma 13)¹⁸; e Não-Hiperdiploide, que engloba translocações cromossômicas envolvendo o locus IgH (cadeia pesada da imunoglobulina) no cromossoma 14q32 e que levam a ativação constitutiva de genes CCND1, CCND3, MAF, MAFB ou FGFR3/MMSET.^{16,19} Estas alterações citogenéticas nos plasmócitos alteram a expressão e função dos miRNAs, que por sua vez afetam vias de sinalização intracelular, tal como se verifica: no MM-hiperdiploide que exhibe perfis de expressão de miRNA específicos envolvendo a via STAT3 e TGF β , nomeadamente diminuição de miRNA-24, -152 e -425²⁰; na t(4;14) que se relaciona com o miR-126 (regulador do MMSET), o downregulation do miR-146a e -135b, upregulation miR-99b e miR-125a-5p^{20,21}; na del13, que se associa a downregulation de miR-16-1, miR-15a e miR-221 e maior expressão de miR-18, miR-19 e miR-20; na del17p13, associada a *downregulation* de miR-192, -194 e -215; t(14;16) associado a *upregulation* miR-1, miR-133a/b.²⁰

Esta associação de miRNAs desregulados (que estimulam/activam vias proliferação e crescimento de células MM) com alterações citogenéticas específicas têm contribuído assim para a hipótese de que os miRNAs podem auxiliar no diagnóstico e avaliação do prognóstico no MM, tal como novas terapêuticas poderão ser desenvolvidas tendo como alvo os miRNAs²².

Também as lesões genéticas secundárias associadas a progressão de doença e sobrevivência, que incluem mutações no Ras e BRAF, o aumento frequência da sobre-expressão de MYC, as alterações do p53 (fator de prognóstico adverso), a ativação IL6-JAK-STAT3 e NF κ B²³, a deleção do cromossoma 13, a perda cromossoma 17p (marcador de MM alto risco) e alterações do cromossoma 1, são reguladas por miRNAs.^{16,24}

Tal verifica-se com miR-21 e miR-19, importantes reguladores e mediadores da via de sinalização IL6-JAK-STAT²⁵, que se encontram *upregulated* no MM e induzem indiretamente STAT3 através da repressão de PIAS3 e SOCS1, inibidores da ativação desta via, contribuindo para o seu papel oncogénico (Anexo 1).^{13,26,25} Já o p53 é reprimido diretamente pelos miR-125b, miR-25 e miR-30d e indiretamente pelo cluster miR-106b~25, miR-32, e miR-181a (que inibem o regulador positivo de p53, o PCAF), que se encontram “upregulated” no MM. Por outro lado, p53 induz transcrição dos miRs -192, -194 e -215, que têm como alvo MDM2, e miR-34a, que tem como alvo SIRT1, que levam a regulação positiva de p53 e cuja desregulação favorece a oncogénese (Anexo 2).^{13,16}

De igual forma o cluster miR-15a/16 demonstrou ser um regulador negativo importante da patogénese do MM, ao inibir as vias *pro-survival* AKT3 E NF- κ B e regular vias implicadas na neo-

angiogénese de plasmócitos e MO.^{9,27} Este cluster tem como alvos o FGFR1, o VEGFa e o MDM4, e encontra-se normalmente *downregulated* no MM^{9,20}, sendo que este *downregulation* parece desempenhar um papel importante na proliferação e crescimento celular no MM²⁸

O *upregulation* do cluster miR- 17~92, cluster essencial ao desenvolvimento de linfócitos B e localizado no 13q31-32, parece igualmente contribuir para a transformação de plasmócitos e progressão do MM, ao regular negativamente genes supressores de tumor, nomeadamente PTEN, E2F1 e BIM (Anexo 3).^{13,29}

O microambiente da medula óssea (MO) promove a libertação de citocinas e fatores de crescimento (IL6), que ativam a via sinalização JAK-STAT3¹⁶, e modula a expressão de determinados miRNAs, através da ligação das células de MM às células do estroma da MO, protegendo as células da apoptose (supressão de miR-15a/16-1) e contribuindo para a proliferação celular, para a resistência à terapêutica com bortezomib e para a indução de angiogénese (miR-199a-5p) e disfunção da osteogénese (miR-135b, -24-3b, -15a-5p)³⁰ Num estudo recente, observaram-se níveis diminuídos de miR-15a, miR-20a, miR -106b, miR -223, miR -361 e aumentados de miR -21, no microambiente da MO de doentes MM, sendo que esta desregulação contribuiu para a proliferação das células MM.^{12,25}

IV. Micro-RNAs como importantes biomarcadores no MM

A profunda instabilidade genética observada no MM contribui para a expressão desregulada de miRNAs fundamentais na diferenciação celular, sendo influenciada igualmente por esta desregulação.

Os principais mecanismos envolvidos nesta desregulação parecem envolver deleção, amplificação, silenciamento epigenético³¹, translocações cromossómicas, mutações no loci do miRNA, alteração do processamento dos miRNAs ou desregulação de fatores de transcrição que têm como alvo miRNAs específicos.^{11, 13}

Os miRNAs desregulados constituem um grupo heterogéneo com diferentes níveis de expressão, quer entre doentes quer no mesmo doente ao longo do tempo, o que é explicado pela existência de diferentes “populações” de plasmócitos tumorais com diferentes alterações genéticas/epigenéticas num mesmo doente.⁹ Tal evidência, associada à potencial relevância prognóstica da instabilidade genética, contribuiu para que vários estudos explorassem a potencial utilização de miRNAs como marcadores de prognóstico e, possivelmente, de diagnóstico^{9,16}

De salientar a crescente evidência de que perfis de expressão de miRNA são potencialmente mais precisos que os perfis de expressão genes tradicionais^{32,33} e que a identificação de alterações na

expressão de miRNA é mais útil se *signatures* específicas de combinações de miRNA relativas a um estado patológico agirem como marcadores precoces da doença ou de gravidade da mesma¹¹.

Desregulação de miRNAs nos diferentes estadios do MM

Recentemente, vários têm sido os miRNAs identificados como estando diferentemente expressos nos plasmócitos, quer de doentes com GMSI quer com MM, comparativamente a indivíduos saudáveis.¹⁶

Num estudo envolvendo 19 pacientes (5 GMSI e 10 MM e 4 saudáveis), verificou-se o upregulation de miRNAs com atividade oncogénica conhecida, nomeadamente miR-21, cluster miR-106b~25, miR-181a, -181b, -32, cluster miR-17-92, em MM e GMSI, em comparação com o grupo de controlo, sendo que tanto o miR-32 como o cluster miR-17-92 parecem ser exclusivos apenas do MM^{16,34}, permitindo a sua distinção de GMSI (Anexo 4). O upregulation dos miRNAs acima mencionados foi demonstrado noutros estudos^{35,36}, tendo um deles detetado ainda o upregulation dos miR-18, miR-221, miR -222 e miR -99a num grupo de 52 casos MM recentemente diagnosticados comparativamente aos grupos controlo.¹⁶

Já a associação do miR-19a, um dos miRNAs abrangidos no cluster miR-17-92, com o miR-4254, ambos significativamente desregulados no soro de doentes com MM, foi capaz de distinguir os doentes MM com sensibilidade de 91,7% e especificidade 90,5%³⁷ (Anexo 5)

Também os níveis de miR-33b parecem discriminar os casos de MM dos indivíduos saudáveis, com uma AUC de 0,876, o que o torna uma possível ferramenta diagnóstica³² (Anexo 6)

Um estudo envolvendo 15 casos de MM recidivado/refratário, em que se procedeu ao *profiling* da expressão de miRNAs, demonstrou uma clara separação do MM dos saudáveis, com miRNAs novamente desregulados nas recidivas, dos quais se destaca o down-regulation miR-15a-16¹⁶

Foi também demonstrado que a combinação dos miR-34a e let-7e séricos distinguem doentes com MM dos saudáveis com sensibilidade de 80,6% e especificidade de 86,7% e GMSI com uma sensibilidade de 91,1% e especificidade de 96,7%³⁸

Apesar dos vários miRNAs identificados como passíveis de identificar/distinguir MM e GMSI, não foi ainda possível estabelecer um perfil de expressão de miRNAs suficientemente robusto que seja capaz de distinguir entre os dois estadios de forma clara. No entanto, apesar da distribuição de miRNAs ser semelhante entre GMSI e MM, com uma variedade de expressão de miRNAs mais ampla no GMSI³⁶, a maioria destes miRNAs mostrou a mesma tendência de desregulação – *upregulation ou downregulation* – desde os controlos até ao MM e, por fim, leucemia plasmócitos secundária a mieloma múltiplo, o que levanta a hipótese do grau desregulação dos miRNAs se

correlacionar com o grau de progressão do tumor e, por isso, estes poderem ser usados como marcadores de deteção precoce de MM ou como preditores da progressão de GMSI para MM.¹⁶ A identificação de doentes com maior risco de progressão possibilitará um tratamento precoce e um melhor prognóstico.³⁶

Micro-RNAs e prognóstico no MM

Nos últimos anos, tendo em conta a crescente evidência do papel essencial dos miRNAs no MM, vários foram os grupos e estudos dedicados à identificação de miRNAs com potencial prognóstico significativo que melhorassem o valor prognóstico dos modelos pré-existent.

Num estudo que envolveu 163 casos de MM, os miRNAs intracelulares miR-17 e miR-886-5p demonstraram forte poder discriminativo da SG média, tendo sido proposto um *score* com base nos mesmos que dividia os doentes em: alto risco com SG de 19,4 meses; risco intermédio com SG de 40,6 meses; baixo risco com SG de 65,3 meses. O valor prognóstico deste *score*, que se revelou independente do ISS e das alterações FISH, mantém-se mesmo após recidiva, com SG média desde a recidiva de 5,1 meses no alto risco, 14,9 meses no risco intermédio e 32,8 meses no baixo risco. Verificou-se ainda que a associação deste *score* ao ISS e ao FISH melhorou a precisão destes últimos, o que sugere que os miRNAs devem ser incluídos nas ferramentas de estratificação de risco no MM.⁹

Demonstrou-se de igual forma que a sobre-expressão de miR-15a, de miR-16-1 e de miRNAs pertencentes ao cluster miR-17-92, nomeadamente miR-17, -20a, -92-1³⁹, sugerem mau prognóstico, correlacionando-se com uma SLP mais curta, de 11,13,13,12,5 e 16 meses respetivamente, comparado com os valores de SLP para níveis de expressão mais baixos (22,5, 18, 26, 23,5 e 20,5 respetivamente).³⁴(Anexo 7)

Também o miR-33b, reconhecido supressor de tumor localizado no cromossoma 17p11.2, parece estar associado a mau prognóstico, uma vez que a diminuição da sua expressão está associada a SLP e SG significativamente mais curtas, de 15 e 19 meses respetivamente, e a resistência ao tratamento com Bortezomib (Anexo 8). De referir que este miRNA encontra-se sub-expresso apenas no MM recentemente diagnosticado e nas recidivas, contrariamente ao verificado nos indivíduos saudáveis ou em remissão, estando associado a alterações de alto risco como del(13q), del(17p), t(4,14), t(4,16). No entanto, o seu valor prognóstico não foi independente, o que pode dever-se ao número limitado de doentes nos estudos ou à possibilidade do efeito prognóstico ser resultado de outros fatores (ex. del17p).³²

Num estudo envolvendo 95 casos MM, também o Mir-155, fator importante na maturação da célula B e no “antibody class switching”⁴⁰ e que se encontra downregulated no MM por um mecanismo de metilação de DNA³⁹, demonstrou ter impacto na SG. Os MM com maior expressão de miR-155 associaram-se a uma SG significativamente maior do que aqueles com uma expressão mais fraca (Anexo 9), para além de que os níveis de miR-155 na recidiva eram muito inferiores aos verificados na altura do diagnóstico.⁴¹

O potencial prognóstico parece não se restringir aos miRNAs propriamente ditos, visto que a evidência tem sugerido que a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas no processamento de miRNA têm igualmente valor prognóstico (Anexo 10). Tal é o caso de EIF2C2/AGO2, cuja sobre-expressão se associa a MM de alto risco,^{9,42} logo com mau prognóstico. De igual forma, a expressão de DICER parece desempenhar um papel importante na progressão e prognóstico das gamopatias monoclonais, na medida em que os seus valores de expressão são mais elevados no GMSI do que no sMM e MM sintomático, além de que se observou uma SLP significativamente mais longa no MM sintomático com expressão mais elevada de DICER (Anexo 11).⁴³

Micro-RNAs extracelulares – potenciais marcadores de prognóstico no MM

Como acima exposto, os perfis de expressão de vários miRNA foram correlacionados com sobrevivência e prognóstico em vários estudos, o que os torna um potencial e poderoso marcador clínico para deteção, classificação, prognóstico no MM^{44,45}; tal potencial aumenta se os miRNA forem detetados no sangue periférico/plasma, tendo em conta a sua potencial superioridade clínica, quando comparados com a análise das células tumorais convencionais, que se prende com a natureza minimamente invasiva na aquisição de amostras, a facilidade de padronização e a possibilidade de amostragem repetida ao longo da progressão da doença.³⁷ Em associação com outros biomarcadores, alterações dos níveis de miRNAs circulantes contribuem para um sistema de classificação e deteção altamente sensível e específica de tumor.³⁷

Os miRNAs extracelulares encontram-se encapsulados em exossomas, secretados por vários tipos de células incluindo as neoplásicas e que podem ser isolados no sangue^{46,28}, ou associados ao complexo Argonaute-2 (AGO-2) fora das vesículas, o que os torna extremamente estáveis e resistentes à degradação por ribonucleases e a condições físico-químicas severas.^{9,11,36} A composição dos exossomas, que inclui proteínas e ácidos nucleicos, depende do estado de transcrição da célula de origem, sendo esta que determina/gera um microambiente responsável pela promoção da tumorigénese. Tal evidência permite concluir que os níveis de expressão dos miRNAs contidos nestes exossomas podem ser utilizados para monitorizar o curso da doença neoplásica^{11,46}

De salientar que o perfil de expressão de miRNAs extracelular/circulantes pode variar entre o *soro* e o plasma, possivelmente devido aos miRNAs derivados das plaquetas ou glóbulos brancos que podem ser libertados durante a formação de coágulos nas amostras séricas, o que pode justificar os níveis mais elevados de miRNAs no soro quando comparado com o plasma. Consequentemente, é ideal que a utilização de um miRNA circulante como biomarcador só seja considerada se este estiver significativamente alterado tanto no plasma como no soro¹²

Ao longo do tempo, tem sido sugerido que a expressão de miRNAs na circulação é comparável à expressão observada nos tecidos tumorais, com o desenvolvimento tumoral a ser associado diretamente à desregulação dos miRNA circulantes.¹¹ Neste sentido, foram identificados vários miRNAs circulantes com potencial prognóstico, como é o caso dos miR-16 e miR-25, que se revelaram marcadores de prognóstico independentes em casos de MM recentemente diagnosticado (Anexo 12).^{10, 44}

Num estudo que envolveu 108 casos de MM recentemente diagnosticado e 56 indivíduos saudáveis, verificou-se a desregulação dos miR-19a, miR-92a, miR-214-3p, miR-135b-5p, miR-4254, miR-3658 e miR-33b no soro. Concluiu-se ainda que a diminuição da expressão miR-19-a se correlacionava positivamente com o avanço no estadiamento ISS, a del(13q14), a amplificação 1q21, associando-se a diminuição da SLP e da SG significativas (Anexo 13). Este miRNA identifica, por isso, MM de alto risco, constituindo um preditor de mau prognóstico, que se mostrou independente das anormalidades genéticas. A sub-expressão de miR-19a, por outro lado, associou-se a uma melhor resposta ao tratamento com bortezomib, com sobrevivência prolongada significativamente nos doentes sob este tratamento.³⁷

Um outro estudo envolvendo 40 casos de MM e 20 indivíduos saudáveis mostrou que a sobre-expressão de miR-483-5p e a sub-expressão do miR-20a se associavam à presença de MM, conseguindo discriminá-lo com uma sensibilidade de 58%/especificidade de 90% e sensibilidade 63%/especificidade de 85%, respetivamente. Os níveis plasmáticos de miR-483-5p foram ainda associados com o estadiamento ISS, sendo que níveis elevados deste miRNA se associaram a uma SLP média de 15 meses comparados com os 21 meses verificados com baixos níveis de expressão (Anexo 14).¹¹

A avaliação de 156 amostras séricas de doentes com MM tratados com bortezomib e dexametasona revelou um conjunto de miRNAs diferencialmente expressos, nomeadamente família let7 (cujo *downregulation* se associa a um estágio ISS mais avançado³⁸), o cluster miR-17-92 e miR-99b-125a.⁴⁶ Dentro destes, verificou-se que a associação miR-106b+mir-18a+let7c circulantes, mostrou ser um factor de prognóstico independente, mesmo após ajuste tendo em conta alterações

citogenéticas e estadiamento ISS, cuja desregulação se associou a SLP mais curta. A utilização deste conjunto de miRNA juntamente com o estadiamento ISS e citogenética demonstrou melhor precisão prognóstica comparada com o ISS e citogenética apenas.⁴⁶

Já noutro estudo foi identificado um conjunto de 14 miRNA diferencialmente expressos no MM recentemente diagnosticado, com potencial diagnóstico e prognóstico, dos quais se destaca miR-16, -17, -19b, -20a, -660, tendo-se verificado maior SLP após transplante autólogo em doentes com níveis superiores de miR-19b e miR-331, comparado com doentes com baixa expressão de miR-19b e miR-331 (Anexo 15).¹⁰

V. Pontos críticos relativos ao uso de miRNAs

Apesar do seu potencial e de vários estudos evidenciarem o valor dos miRNA como biomarcadores, ainda são vários os estudos publicados discordantes quanto aos miRNAs a serem utilizados, não tendo sido ainda possível estabelecer um perfil de expressão de miRNAs robusto que possa ser incluído nos modelos de avaliação de um doente com MM. Tal acontece devido: à heterogeneidade que é característica de MM; à análise de um coorte de pacientes não homogéneo, o que pode afectar a reprodutibilidade dos resultados; ao uso de diferentes plataformas para a análise de expressão de miRNA; quantidade baixa ou baixa qualidade de amostras disponíveis; não validação dos miRNA desregulados em estudos com coortes maiores e mais homogéneos.

O papel dos miRNAs como marcadores de prognóstico foi determinado até à data com base em análises efectuadas em centros isolados e, por isso, validações usando coortes maiores, com doentes uniformemente tratados, com um maior tempo de seguimento, são necessários, a fim de incluir os miRNAs no modelo de prognóstico.

VI. Conclusão

Os miRNA têm-se revelado importantes na modulação das vias envolvidas na patogénese do MM, podendo mesmo a sua desregulação ser correlacionada com a progressão da doença e com os subtipos moleculares genéticos do MM. Tal evidência sugere que, associados a outros biomarcadores, os miRNAs potencialmente contribuem para um sistema de classificação, de deteção tumoral e de prognóstico altamente sensível e específico, com capacidade de melhorar a prática clínica, especialmente ao nível da abordagem do doente e da decisão terapêutica.

VII. Agradecimentos

Ao Professor Doutor João Forjaz Lacerda, pela sua disponibilidade e por ter aceite o pedido de realização deste trabalho na Clínica Universitária de Hematologia.

À Dra. Helena Martins pela sua preciosa orientação, revisão crítica do texto e tempo generosamente dedicado, indispensáveis para a elaboração deste trabalho.

Aos meus familiares e amigos que contribuíram com apoio incondicional, acreditando sempre no meu empenho pessoal.

Referências Bibliográficas

1. Röllig C, Knop S, Bornhäuser M. Multiple myeloma. *Lancet*. 2015;385(9983):2197-2208. doi:10.1016/S0140-6736(14)60493-1.
2. Palumbo A, Anderson K. Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2011;364(11):1046-1060. doi:10.1056/NEJMra1011442.
3. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2014 Update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2014;89(10):999-1009. doi:10.1002/ajh.00039.
4. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Clin Trials and Obs*. 2009;113(22):5418-5422. doi:10.1182/blood-2008-12-195008.
5. Agarwal A, Ghobrial IM. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: A review of the current understanding of epidemiology, biology, risk stratification, and management of myeloma precursor disease. *Clin Cancer Res*. 2013;19(5):985-994. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2922.
6. Eslick R, Talaulikar D. Multiple myeloma: From diagnosis to treatment. *Aust Fam Physician*. 2013;42(10):684-688.
7. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK*. 2009;23(12):2210-2221. doi:10.1038/leu.2009.174.
8. Rajkumar SV, Kyle RA, Connor RF. Staging and prognostic studies in multiple myeloma. UpToDate.
9. Rocci A, Hofmeister CC, Pichiorri F. The potential of miRNAs as biomarkers for multiple myeloma. *Expert Rev Mol Diagn*. 2014;1-13. doi:10.1586/14737159.2014.946906.
10. Navarro A, Díaz T, Tovar N, et al. A serum microRNA signature associated with complete remission and progression after autologous stem-cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Oncotarget*. 2015;6(3):1874-1883. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4359338&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
11. Qu X, Zhao M, Wu S, et al. Circulating microRNA 483-5p as a novel biomarker for diagnosis survival prediction in multiple myeloma. *Med Oncol*. 2014;31(10):219. doi:10.1007/s12032-014-0219-x.
12. Wang W, Corrigan-Cummins M, Barber EA, et al. Aberrant Levels of miRNAs in Bone Marrow Microenvironment and Peripheral Blood of Myeloma Patients and Disease Progression. *J Mol Diagnostics*. 2015;17(6):669-678. doi:10.1016/j.jmoldx.2015.06.006.
13. Pichiorri F, De Luca L, Aqeilan RI. MicroRNAs: New Players in Multiple Myeloma. *Front Genet*. 2011;2(May):22. doi:10.3389/fgene.2011.00022.
14. Madhavan D, Cuk K, Burwinkel B, Yang R. Cancer diagnosis and prognosis decoded by blood-based circulating microRNA signatures. *Front Genet*. 2013;4(June):116.

doi:10.3389/fgene.2013.00116.

15. Serra M, Roseti L, Bassi A. Functional Analysis of microRNA in Multiple Myeloma. *Methods Mol Biol.* 2014;(October 2013):33-41. doi:10.1007/7651.
16. Bi C, Chng WJ. MicroRNA: Important player in the pathobiology of multiple myeloma. *Biomed Res Int.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/521586.
17. Press D. Identification of the key genes connected with plasma cells of multiple myeloma using expression profiles. 2015:1795-1803.
18. Faiman B. Myeloma Genetics and Genomics: Practice Implications and Future Directions. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2014;14(6):436-440. doi:10.1016/j.clml.2014.07.008.
19. Martino MT Di, Guzzi PH, Caracciolo D, et al. Integrated analysis of microRNAs, transcription factors and target genes expression discloses a specific molecular architecture of hyperdiploid multiple myeloma. *Oncotarget.* 2015;6(22).
20. Saki N, Abroun S, Hajizamani S, Rahim F, Shahjahani M. Association of Chromosomal Translocation and miRNA Expression with the Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Cell J.* 2013;16(2):99-110. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24567933>.
21. Chi J, Ballabio E, Chen X-H, et al. MicroRNA expression in multiple myeloma is associated with genetic subtype, isotype and survival. *Biol Direct.* 2011;6(1):23. doi:10.1186/1745-6150-6-23.
22. Di Martino MT, Leone E, Amodio N, et al. Synthetic miR-34a mimics as a novel therapeutic agent for multiple myeloma: In vitro and in vivo evidence. *Clin Cancer Res.* 2012;18(22):6260-6270. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1708.
23. Bommert K, Bargou RC, St??hmer T. Signalling and survival pathways in multiple myeloma. *Eur J Cancer.* 2006;42(11):1574-1580. doi:10.1016/j.ejca.2005.12.026.
24. Löffler D, Brocke-heidrich K, Pfeifer G, et al. Interleukin-6 – dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer Brief report Interleukin-6 – dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated ind. 2012;110(4):1330-1333. doi:10.1182/blood-2007-03-081133.
25. Ma J, Liu S, Wang Y. MicroRNA-21 and multiple myeloma: small molecule and big function. *Med Oncol.* 2014;31(8):94. doi:10.1007/s12032-014-0094-5.
26. Dimopoulos K, Gimsing P, Grønbaek K. Aberrant microRNA expression in multiple myeloma. *Eur J Haematol.* 2013;91(2):95-105. doi:10.1111/ejh.12124.
27. Roccaro AM, Sacco A, Thompson B, et al. MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. *Blood.* 2009;113(26):6669-6680. doi:10.1182/blood-2009-01-198408.
28. Yusnita Y, Mpath IZ, Mbbs KMC, Purushotaman VS. MicroRNA (miRNA) expression profi ling of peripheral blood samples in multiple myeloma patients using microarray. 2012;34(2):133-143.
29. Lu, M; Kotelchuck, M; Hogan, V; Jones, L; Wright K, Halfon N. Role of microRNAs from

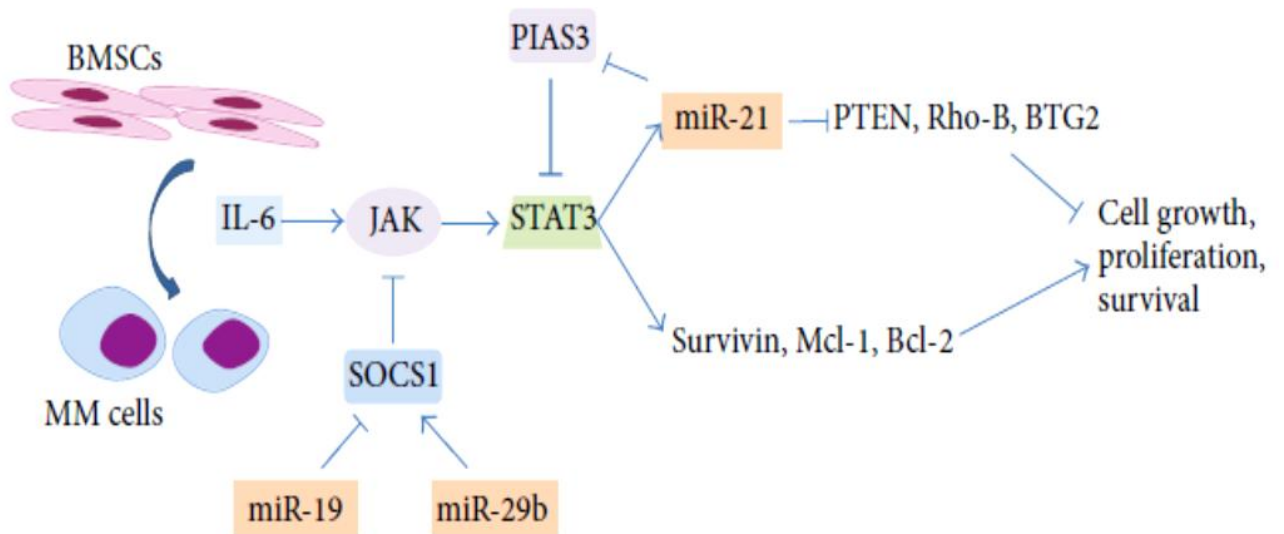
- monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) to multiple myeloma. *Ethn Dis*. 2010;20(1 Supplement):1-26. doi:10.1002/jcp.24872.The.
30. Abdi J, Qiu L, Chang H. Micro-RNAs, New performers in multiple myeloma bone marrow microenvironment. *Biomark Res*. 2014;2(1):10. doi:10.1186/2050-7771-2-10.
 31. Wong KY, Huang X, Chim CS. DNA methylation of microRNA genes in multiple myeloma. *Carcinogenesis*. 2012;33(0):1629-1638. doi:10.1093/carcin/bgs212.
 32. Li F, Hao M, Feng X, et al. Downregulated miR-33b is a novel predictor associated with disease progression and poor prognosis in multiple myeloma. *Leuk Res*. 2015;39(7):793-799. doi:10.1016/j.leukres.2015.04.010.
 33. van Laar R, Flinchum R, Brown N, et al. Translating a gene expression signature for multiple myeloma prognosis into a robust high-throughput assay for clinical use. *BMC Med Genomics*. 2014;7(1):25. doi:10.1186/1755-8794-7-25.
 34. Gao X, Zhang R, Qu X, et al. MiR-15a, miR-16-1 and miR-17-92 cluster expression are linked to poor prognosis in multiple myeloma. *Leuk Res*. 2012;36(12):1505-1509. doi:10.1016/j.leukres.2012.08.021.
 35. Pichiorri F, Suh S-S, Ladetto M, et al. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(35):12885-12890. doi:10.1073/pnas.0806202105.
 36. Jones CI, Zabolotskaya M V, King AJ, et al. Identification of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for use in multiple myeloma. *Br J Cancer*. 2012;107(12):1987-1996. doi:10.1038/bjc.2012.525.
 37. Hao, M., Zang, M., Wendlandt, E., Xu, Y., An, G., Gong, D., Li, F., Qi, F., Zhang, Y., Yang, Y., Zhan, F. and Qiu L. Low serum miR-19a expression as a novel poor prognostic indicator in multiple myeloma. *Int J Cancer*. 2015;136(8):1835-1844. doi:10.1002/ijc.29199.
 38. Kubiczкова L, Kryukov F, Slaby O, et al. Circulating serum microRNAs as novel diagnostic and prognostic biomarkers for multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica*. 2014;99(3):511-518. doi:10.3324/haematol.2013.093500.
 39. Seckinger A, Meißner T, Moreaux J, et al. miRNAs in multiple myeloma – a survival relevant complex regulator of gene expression. *Oncotarget*. 2015;6(36):6-8.
 40. Ferrajoli A, Shanafelt TD, Ivan C, et al. Prognostic value of miR-155 in individuals with monoclonal B-cell lymphocytosis and patients with B-chronic lymphocytic leukemia Supplementary Results Supplementary Figures 1 to 9 Supplementary Tables 1 to 4 pages. *Blood*. 2015;122(11):1891-1900. doi:10.1182/blood-2013-01-478222.A.F.
 41. Krzeminski P, Sarasquete ME, Misiewicz-Krzeminska I, et al. Insights into epigenetic regulation of microRNA-155 expression in multiple myeloma. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. 2015;1849(3):353-366. doi:10.1016/j.bbagr.2014.12.002.
 42. Zhou Y, Chen L, Barlogie B, et al. High-risk myeloma is associated with global elevation of miRNAs and overexpression of EIF2C2/AGO2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(17):7904-7909. doi:10.1073/pnas.0908441107.

43. Sarasquete ME, Gutiérrez NC, Misiewicz-Krzeminska I, et al. Upregulation of dicer is more frequent in monoclonal gammopathies of undetermined significance than in multiple myeloma patients and is associated with longer survival in symptomatic myeloma patients. *Haematologica*. 2011;96(3):468-471. doi:10.3324/haematol.2010.033845.
44. Rocci a, Hofmeister CC, Geyer S, et al. Circulating miRNA markers show promise as new prognosticators for multiple myeloma. *Leukemia*. 2014;28(9):1922-1926. doi:10.1038/leu.2014.155.
45. Yu J, Qiu X, Shen X, et al. miR-202 expression concentration and its clinical significance in the serum of multiple myeloma patients. *Ann Clin Biochem*. 2014;51(Pt 5):543-549. doi:10.1177/0004563213501155.
46. Manier S, Avet-Loiseau H, Campigotto F, et al. Circulating exosomal microRNAs are critical prognostic markers independent of cytogenetics and International Staging System in Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015;15:e47-e48. doi:10.1016/j.clml.2015.07.183.

Anexos

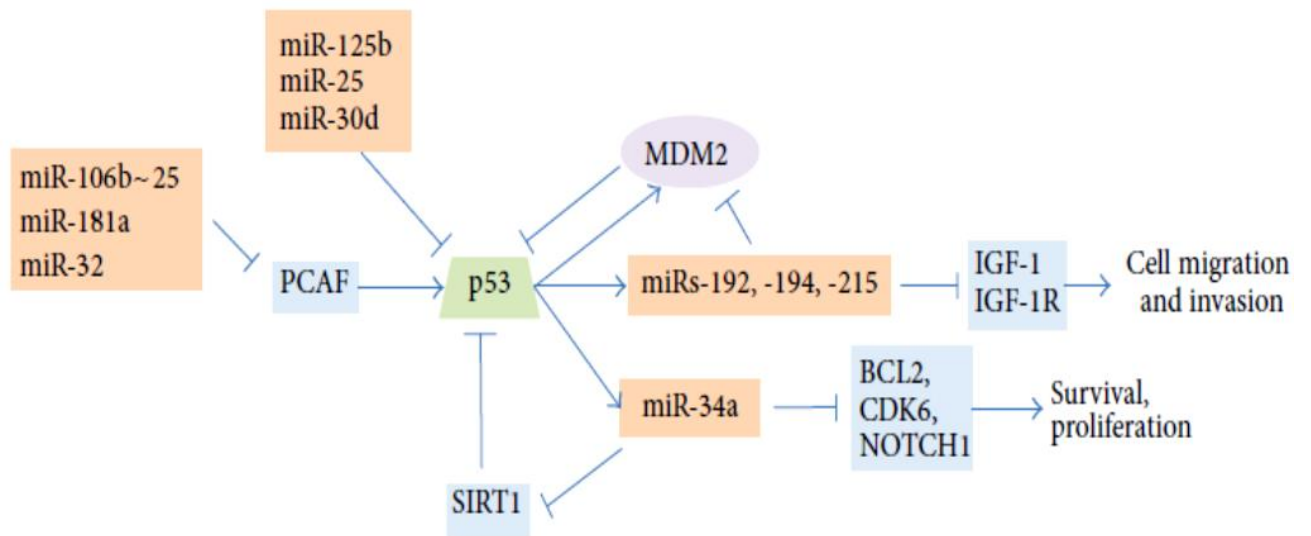
Anexo 1

Anexo 1 – miRNA e via de sinalização IL6-STAT3 no MM: papel dos miR-21 e -19 na promoção de STAT3¹⁶



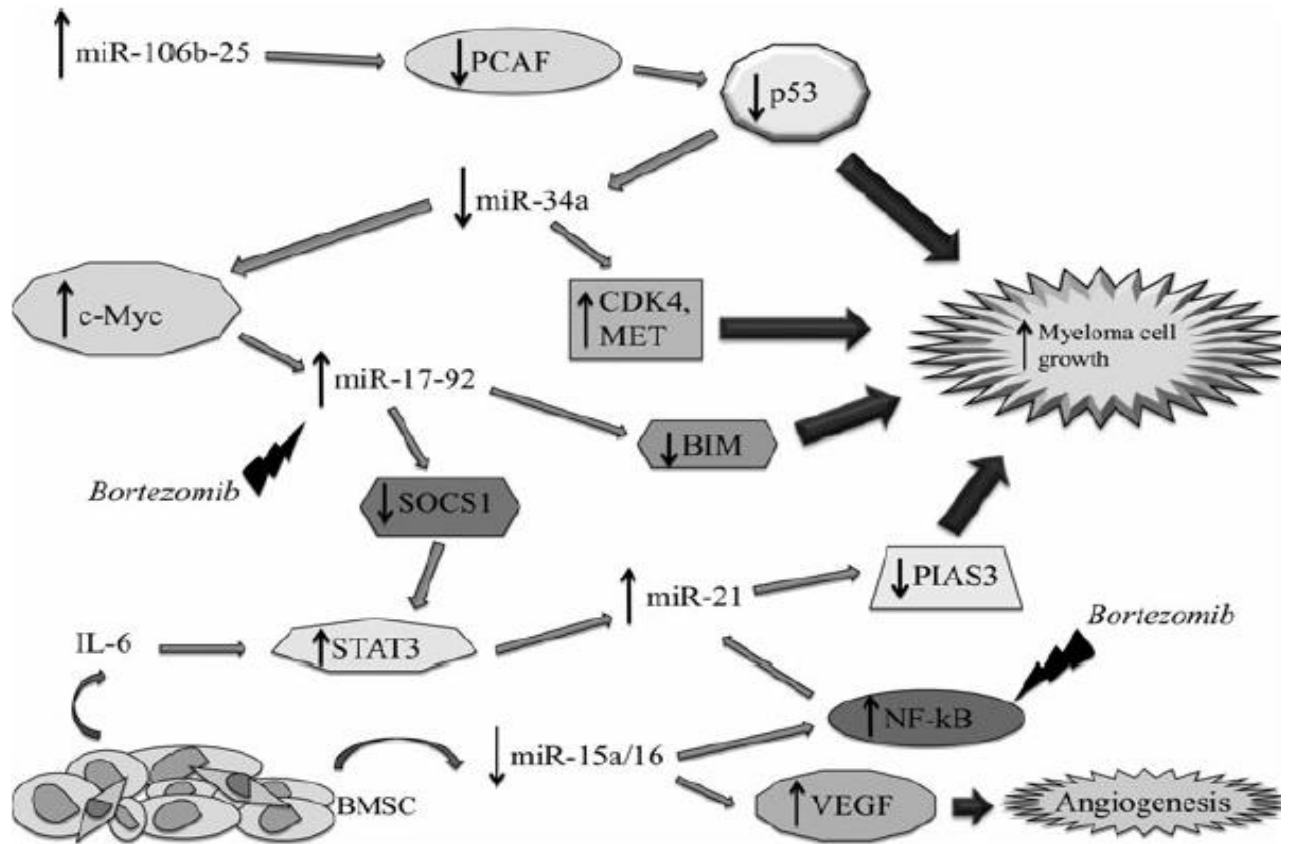
Anexo 2

Anexo 2 – miRNA e p53 no MM¹⁶



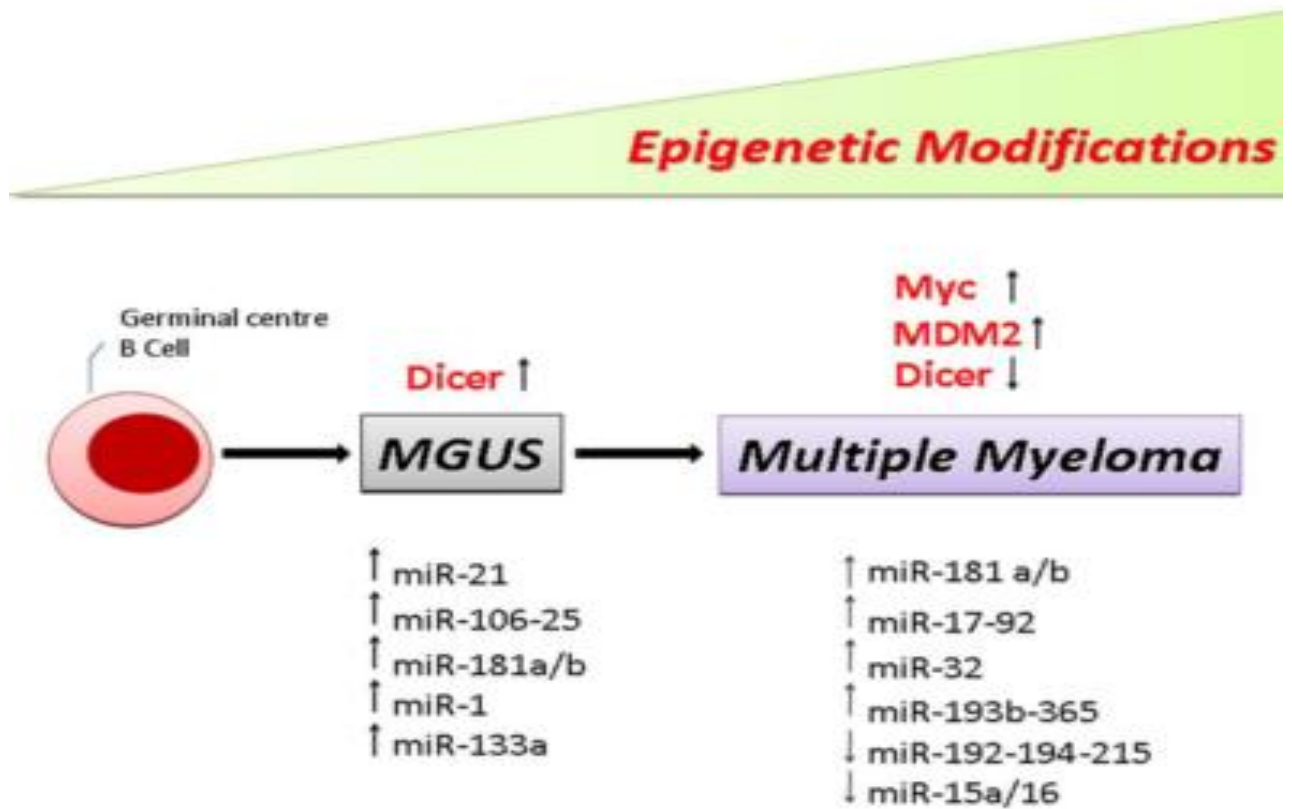
Anexo 3

Anexo 3 – *miRNA network* e a patogénese do MM²⁶



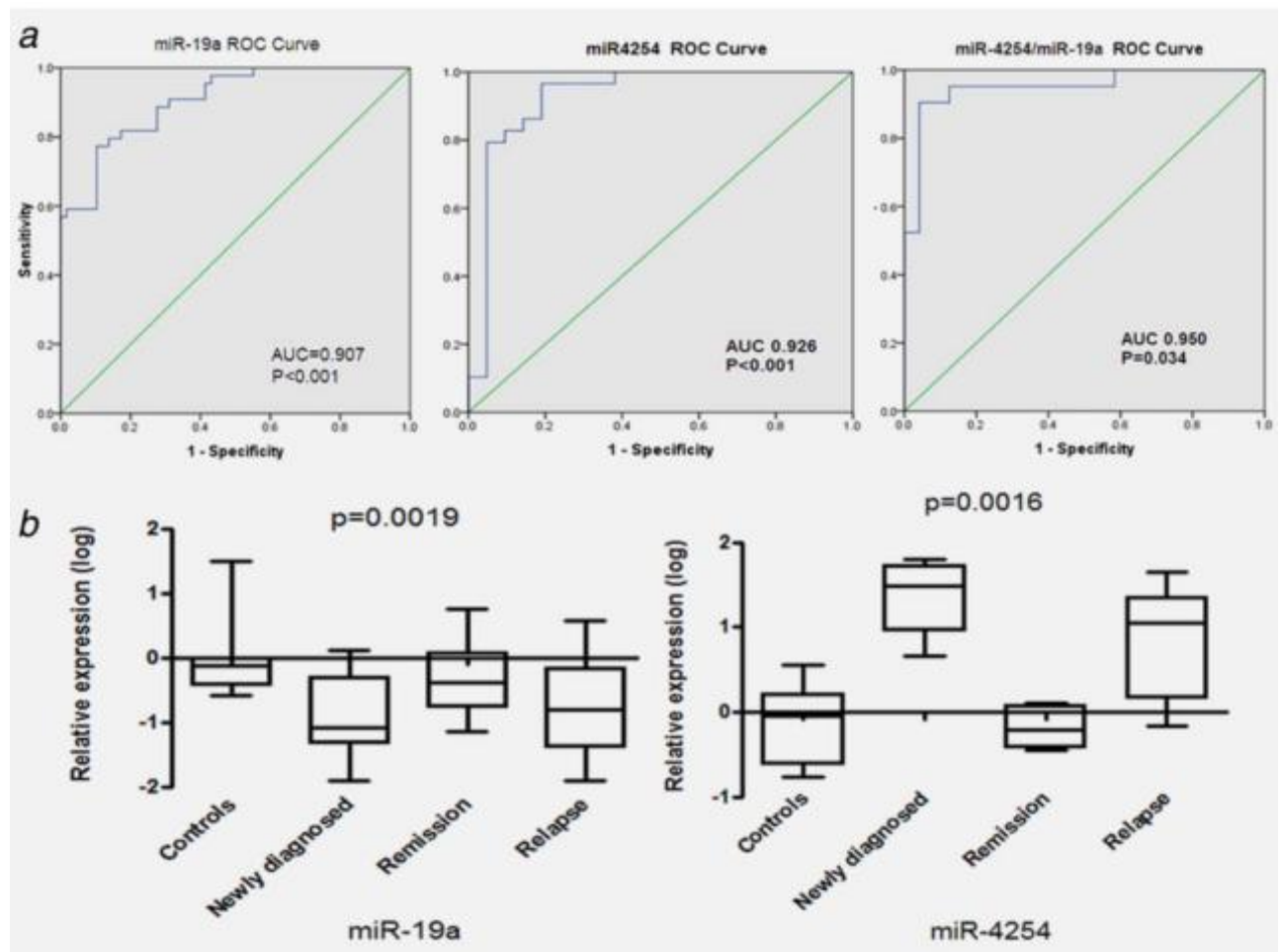
Anexo 4

Anexo 4 – miRNAs e genes significativamente desregulados na GMSI e no MM vs plasmócitos normais¹³



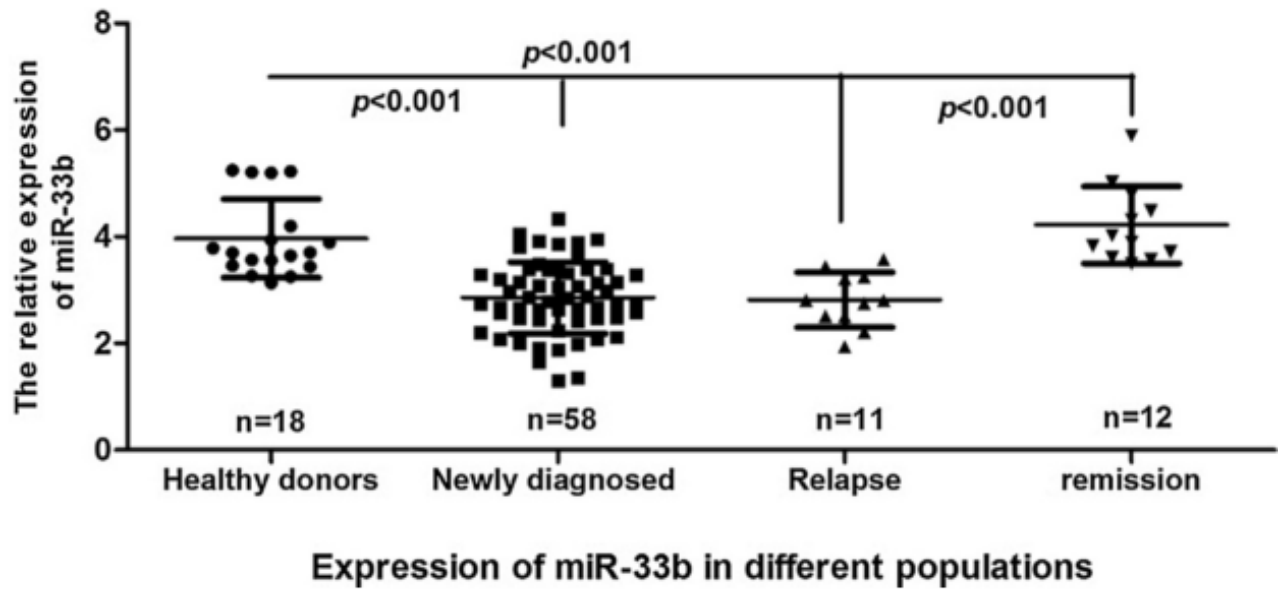
Anexo 5

Anexo 5 – Associação miR-19a e miR-4254 – biomarcador poderoso para identificar MM³⁷



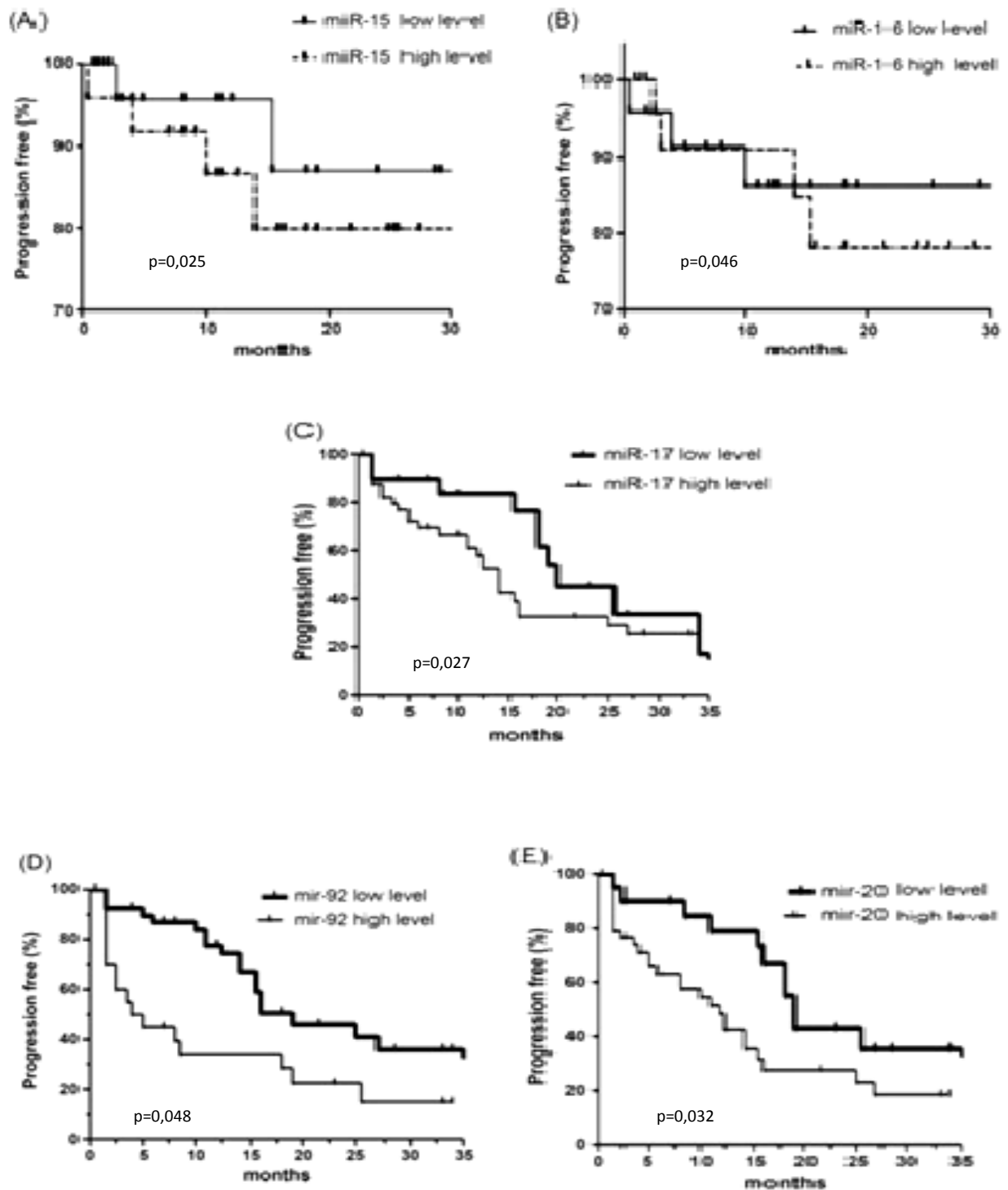
Anexo 6

Anexo 6 – Comparação expressão miR-33b entre 58 MM recentemente diagnosticados, 11 recidivas, 12 em remissão e 18 indivíduos saudáveis.³²



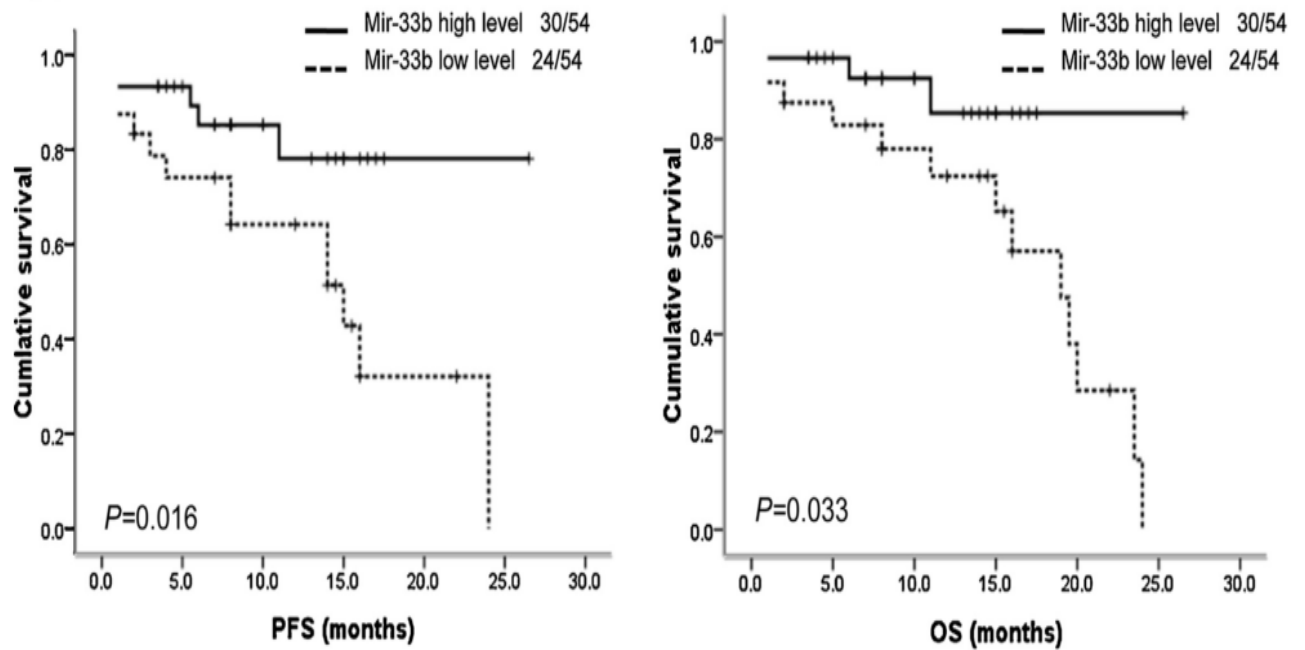
Anexo 7

Anexo 7 – Correlação entre expressão de miR-15a, miR-16-1, cluster miR-17-92 e SLP - Maior expressão associada a SLP mais curta³⁴



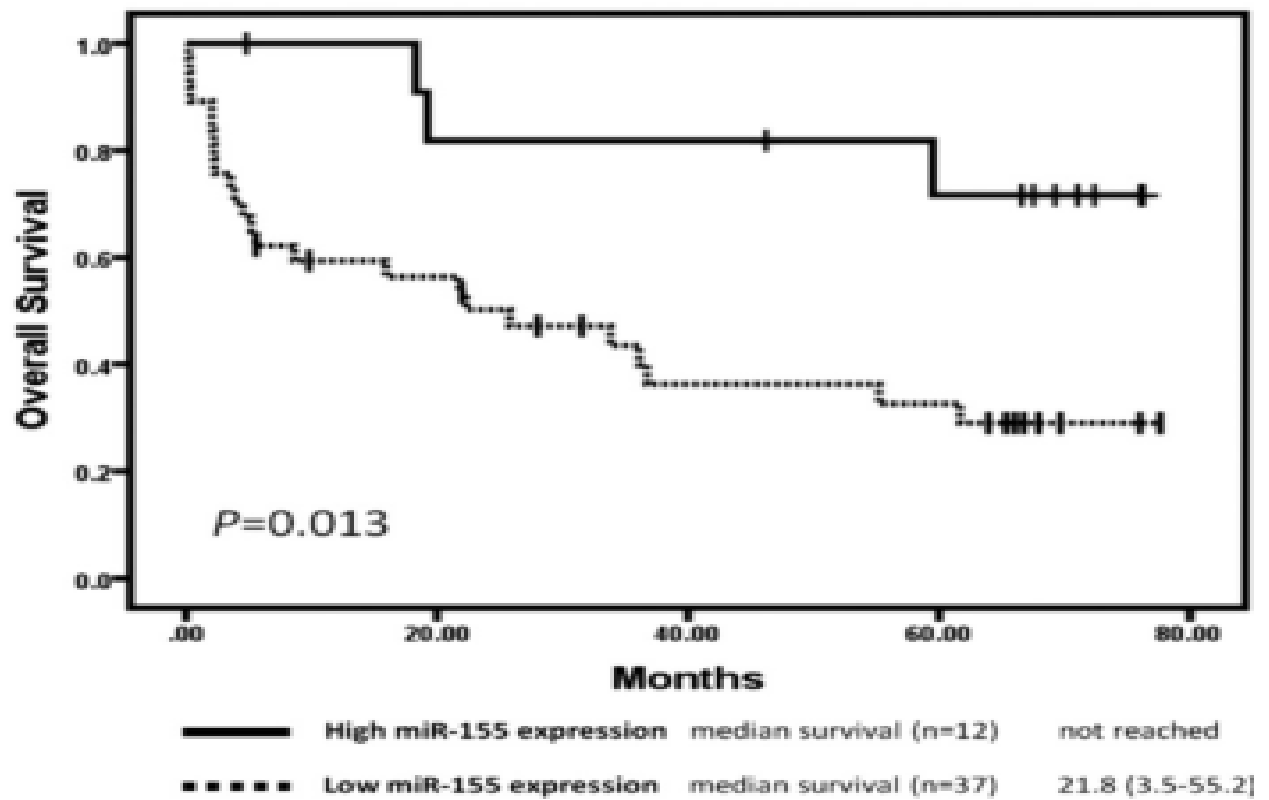
Anexo 8

Anexo 8 – Análise sobrevivência em MM recentemente diagnosticados - menor expressão de miR-33b associada a SLP e SG significativamente mais curtas³²



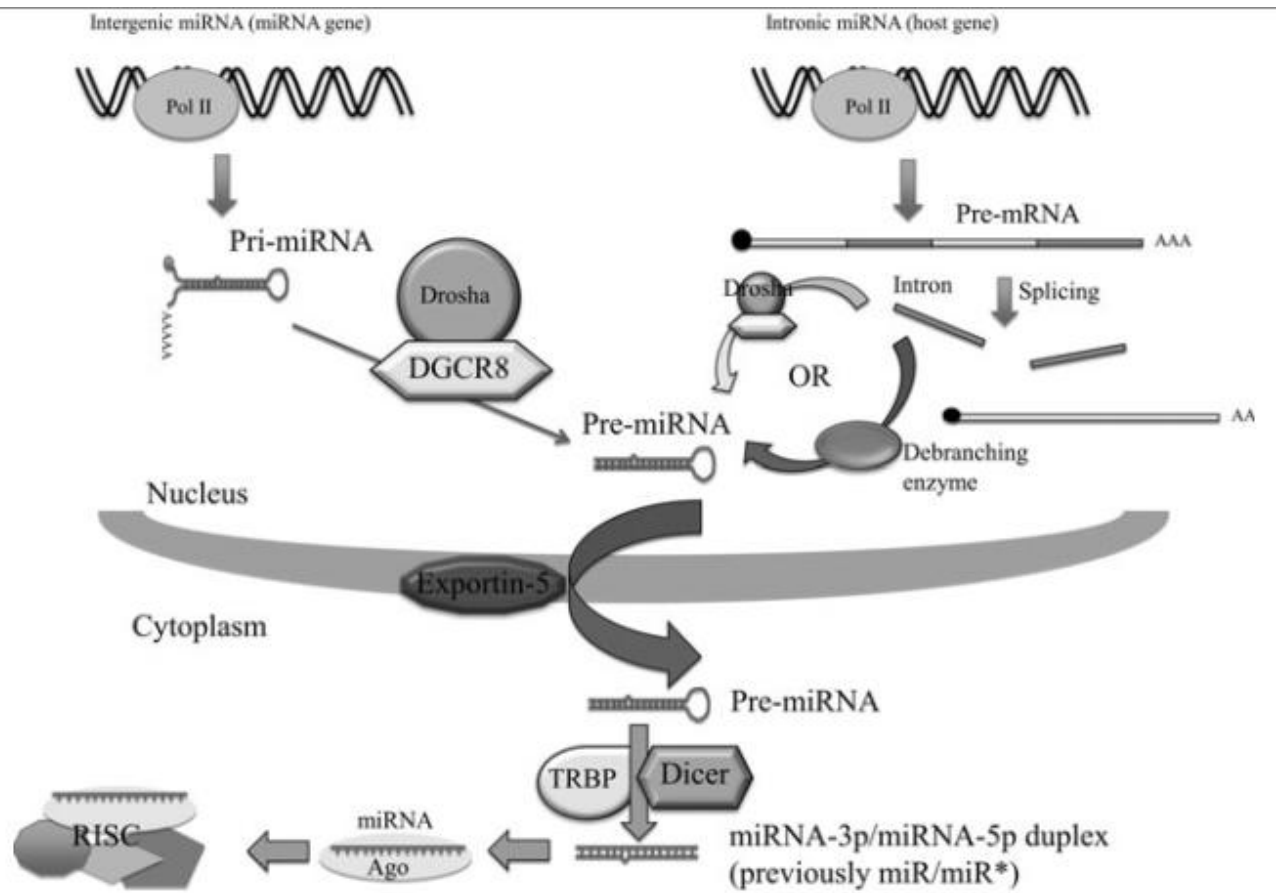
Anexo 9

Anexo 9 – Expressão de miR-155 e SG⁴¹



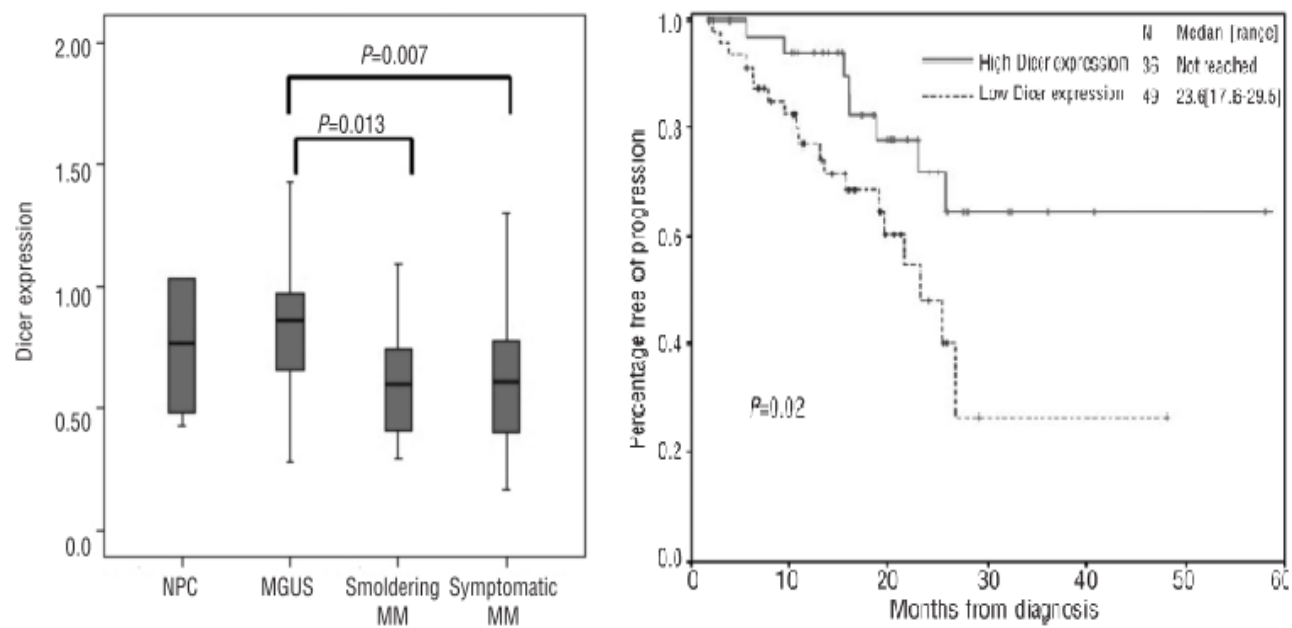
Anexo 10

Anexo 10 – Biogénese de miRNAs²⁶



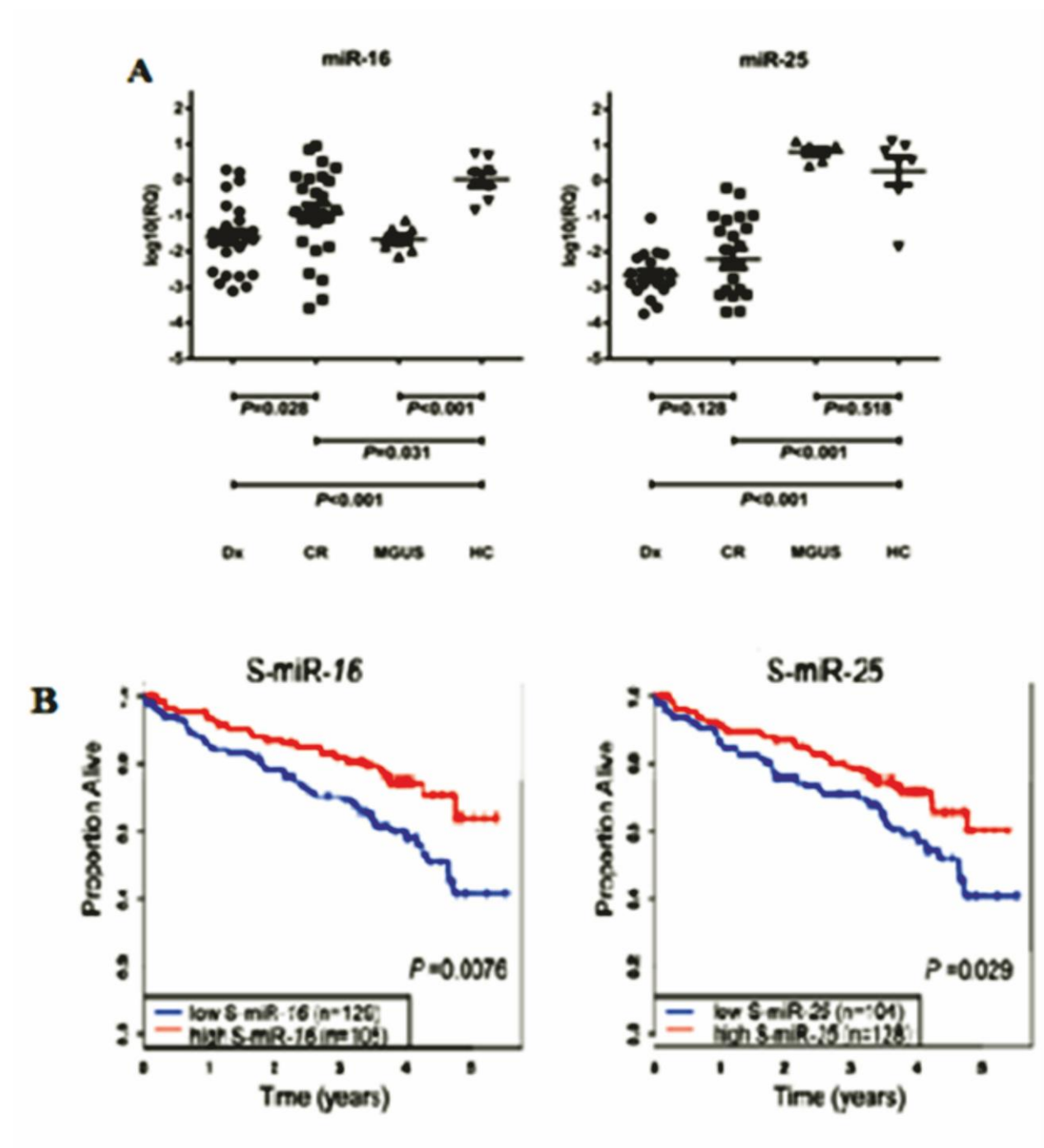
Anexo 11

Anexo 11 – Expressão de DICER nos diferentes estadios de MM e correlação com SLP⁴³



Anexo 12

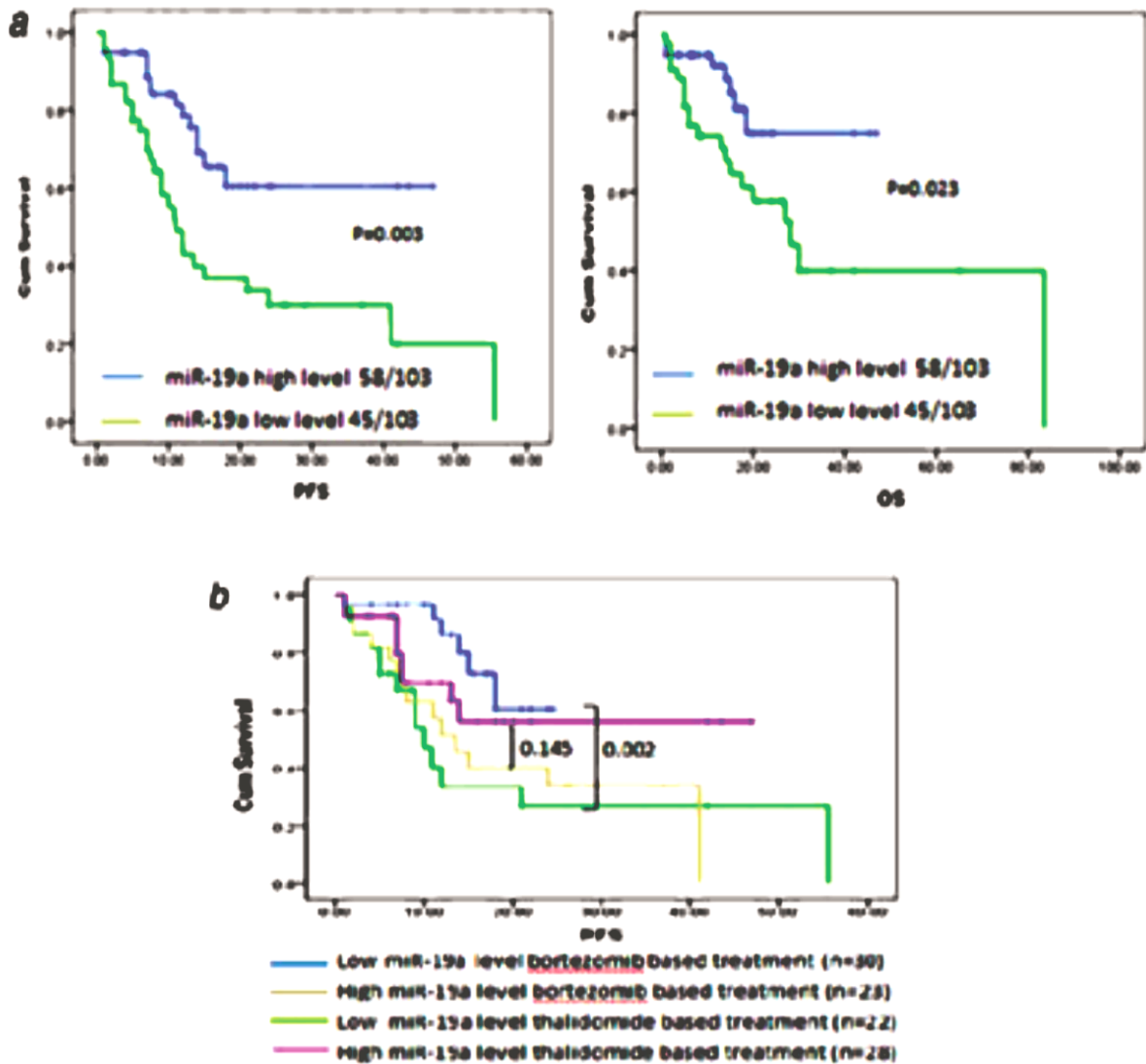
Anexo 12 – miR-16 e miR-25^{10, 44}



A – níveis séricos no MM recentemente diagnosticado (Dx), MM em remissão (CR), GMSI e indivíduos saudáveis (HC);
B – curva SG para baixos/altos níveis de expressão de miR-16 e -25

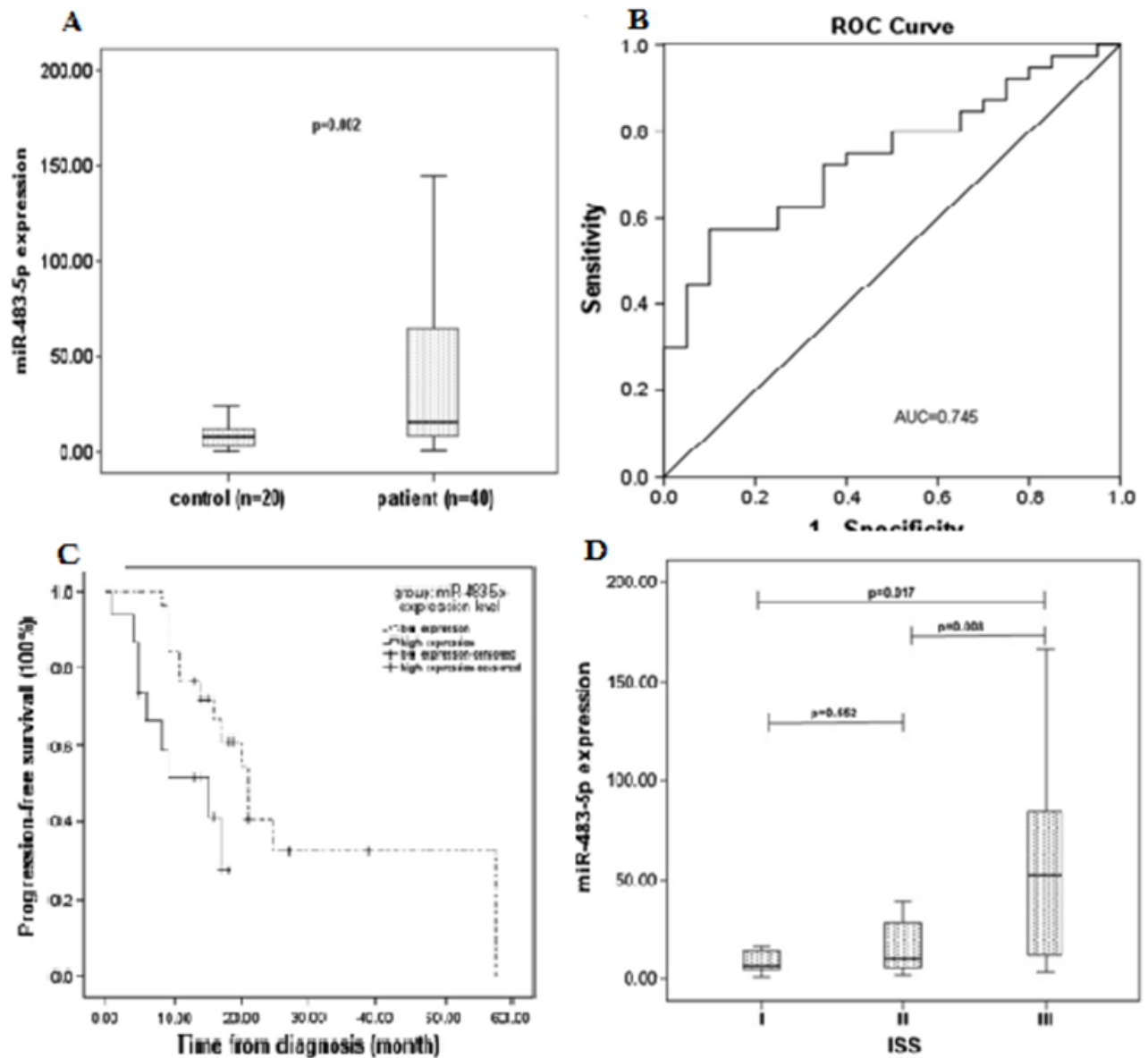
Anexo 13

Anexo 13 – Valor prognóstico do nível de expressão miR-19a no MM³⁷



Anexo 14

Anexo 14 – miR-483-5p extracelular no MM¹¹



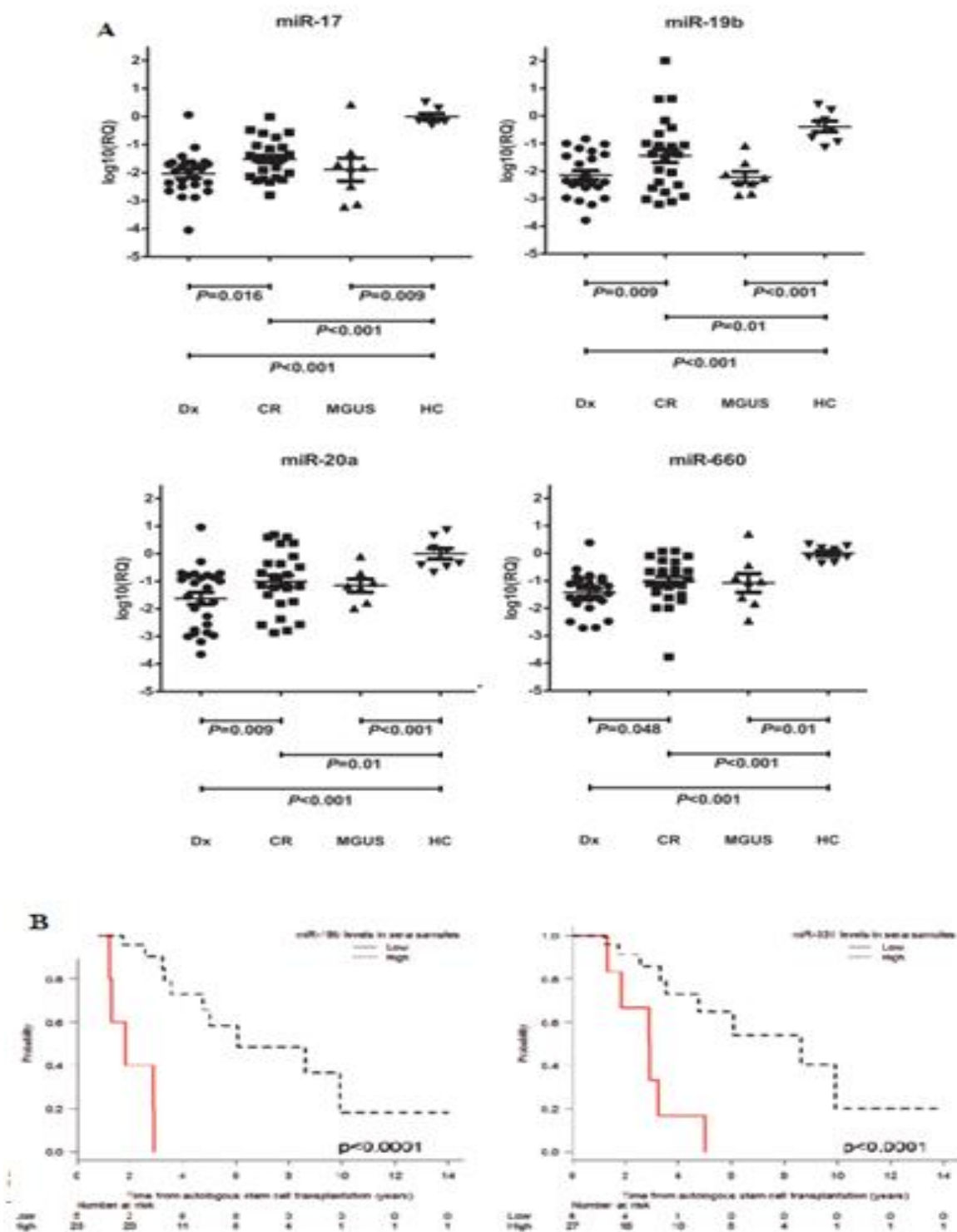
A. Nível de expressão no plasma de doentes ($p = 0.002$).

B. miR-483-5p plasmático - AUC de 0.745 (95 %CI 0.622–0.868; $p = 0.002$).

C. SLP no MMD. Relação entre níveis de expressão miR-483-5p e estadiamento ISS.

Anexo 15

Anexo 15 – Expressão de miRNAs em diferentes estadios MM e relação SLP pós transplante com miR-19b/-331¹⁰



A - Níveis de expressão sérica dos miR-17, -19b, -20a, -660 em MM recentemente diagnosticado (Dx), remissão completa (CR), MGUS e indivíduos saudáveis (HC)

B - SLP após transplante autólogo de acordo com os níveis de expressão sérica de miR-19b e miR-331

Anexo 16

Anexo 16 – miRNAs desregulados no MM¹⁶

| miRNA | Deregulation in MM (versus normal control unless specified) | Targets/function/clinical relevance | Association with clinical parameters |
|---|--|--|--|
| 21 | Upregulated in MM and MGUS upregulated in primary PCL versus MM | PLAS3 PTEN Rho-B BTG2 induced by STAT3 in response to IL-6 | |
| 221, 222 | 221: upregulated in MM 222: upregulated in MGUS, MM 221 and 222: upregulated in relapse/refractory MM | p27Kip1, PUMA, PTEN and p57Kip2 | |
| 17-92 cluster (17, 18a, 19a, 19b-1, 20a, 92a) | Upregulated in MM but not in MGUS upregulated in MM Positively regulated by Myc lower plasma miR-92a level in MM than MGUS, SMM and normal. | BIM, SOCS1; P21 | Higher 92a was associated with shorter OS Higher 17, 20a, and 92-1 were associated with shorter PFS higher 17 and 18a were associated with shorter OS Higher plasma miR-20a was associated with shorter relapse-free survival |
| 106b-25 cluster (106b, 93, 25) | Upregulated in MM and MGUS upregulated in MM miR-25 is overexpressed in MM | PCAF | miR-106b was correlated with treatment response |
| 181a/b | Upregulated in MM and MGUS upregulated in MM | PCAF | miR-181a* and miR-181b were correlated with treatment response |
| 25, 30d, 125b | Upregulated in MM | P53 | |
| 32 | Upregulated in MM not in MGUS | PCAF | |
| 15a and 16-1 | Decreased in relapsed/refractory MM decreased in MM decreased in patients with 13del as compared to those without expressed in MM independent of chr13 status | AKT3, rpS6, MAP-kinases, MAP3KIP, VEGF | Decreased in patients with ISS stage III higher expression correlates with shorter PFS |
| 192, 194, 215 | Downregulated in MM by promoter hypermethylation | Activated by TP53 and targeted MDM2, IGFI, IGFI | |
| 34 family | Downregulated in MM by promoter hypermethylation | BCL2, CDK6 and NOTCH1 | |
| 203 | Downregulated in MM decreased in MGUS and MM by promoter hypermethylation | CREB1 | |
| 33b | Downregulated in MM | Involved in MLN2238-induced apoptotic signaling in MM cells | |
| 29b | Wide variation of expression in MM and further decreased with the presence of BMSCs | DNMT3A/B CDK6 MCL-1 Spl Targeted VEGFA, IL8; induced SOCS1 | |
| 425, 152, 24 | Downregulated in hyperdiploid MM versus nonhyperdiploid MM | CCND1, TACC3, MAFB, FGFR3, MYC | |
| 214 | Downregulated in MM versus normal PCs possibly by methylation [121] | PSMD10 | |
| 126* | Downregulated in t(4;14) MM cells; inhibited by MMSET by heterochromatin modification | c-Myc | |

Anexo 17

Anexo 17 – miRNAs expressos no MM⁹

| Source of miRNAs | miRNA platform used for analysis | miRNAs | Comment |
|------------------|--|--|--|
| PCs | Custom microarray stem loop-RT-PCR | miR-181a and -181b are up in MGUS and MM miR-32 and -17-92 cluster are up in MM | Identification of miRNAs responsible for multistep pathogenesis of MM |
| PCs | Custom microarray stem loop-RT-PCR | miR-192, -194 and -215 are down in MM | Demonstration of a two-way interaction between miRNAs and p53 |
| PCs | Luminex array stem loop-RT-PCR | miR-15a and -16 are down in MM, miR-222, -221 and -382 are up in MM, miR-181a and -181b are up in MM | miR-15a and miR-16 regulate tumor proliferation |
| PCs | Affymetrix array stem loop-RT-PCR | miR-11 and miR-886-5p are prognostic marker of OS | First intercellular miRNA signature to predict clinical outcome |
| PCs | Agilent array stem loop-RT-PCR | miR-425, -152, -24 are down in hyperdiploid MM | miRNAs dysregulation can mimic the oncogenic effect of IgH translocation |
| PCs | Agilent array stem loop RT-PCR | miR-497, miR-106b, miR-181a*, miR-181b correlates with clinical outcome | miRNA expression as prognostic factor in plasma cell leukemia |
| Exosomes | TaqMan PCRmiR profilingstem loop-RT-PCR | miR-15a is lower in mesenchymal stromal cells derived vesicles compared with healthy subject | miRNA-rich exosomes secreted from MM-mesenchymal stromal cells facilitate MM progression |
| Serum | TaqMan PCR miR profiling stem loop-RT-PCR | miR-744, -130a, let-7d, let-7e are down in MM, miR-34a is up in MM | Different circulating miRNAs in MM compared with MGUS or healthy donors |
| Serum | NanoString nCounter miR-assay stem loop-RT-PCR | miR-92a, -30, -451 are down in MM, miR-720 is up in MM | Comparison of circulating miRNAs between MM and age-matched healthy donors |
| Serum | NanoString nCounter miR-assay stem loop-PCR | miR-16 and miR-25 are up in good prognosis patients | First report of prognostic factor of circulating miRNAs in 288 patients with MM |

MGUS: Monoclonal gammopathy of undetermined significance; MM: Multiple myeloma; PCs: Plasma cells.